

ÜBER DIE AZUROPHILEN GRANULA
DER LYMPHOZYTEN UND IHR VERHALTEN
BEI EXPERIMENTELLEM ALLERGISCHEM
KONTAKTEKZEM DER MEERSCHWEINCHEN

Alfred Kollmann

1975

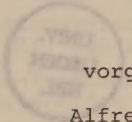
Aus der Dermatologischen Klinik der Universität München

Direktor (Vorstand): Dr. O. Braun-Falco

ÜBER DIE AZUROPHILEN GRANULA
DER LYMPHOZYTEN UND IHR VERHALTEN
BEI EXPERIMENTELLEM ALLERGISCHEM
KONTAKTEKZEM DER MEERSCHWEINCHEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Alfred Kollmann

aus

Tschaslau/Tschechoslowakei

Wiesneck 1974

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr.S.Marghescu
Mitberichterstatter: Professor Dr.O.Braun-Falco
Dekan:

Tag der mündlichen Prüfung: 1.7.1975



Inhaltsverzeichnis

I.	EINLEITUNG	1
II.	LYMPHOZYTEN BEI KONTAKTEKZEM	2
	1) Histologische Untersuchungen	2
	2) Histochemische Untersuchungen	3
	3) Elektronenmikroskopische Untersuchungen	4
	4) Zusammenfassung	4
III.	PATHOGENESE DER ÜBEREMPFINDLICHKEIT VOM SPÄTTYP	5
	1) Aktive Sensibilisierung	5
	2) Beteiligung der regionären Lymphknoten	5
	3) Passive Sensibilisierung	6
	4) Transferfaktor	7
	5) Lymphozyt als immunkompetente Zelle	7
	6) Klonale Selektionstheorie	8
	7) Entwicklung der Gedächtniszellen	9
	8) Beziehungen zwischen Lymphozyten und Makrophagen im allergischen Infiltrat	9
IV.	AZUROPHILE GRANULA	12
	1) Geschichtliches	12
	2) Morphologie im Lichtmikroskop	13
	3) Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen	14
	4) Elektronenmikroskopische Untersuchungen	15
	5) Histochemische Untersuchungen	15
	6) Stimulationsversuche mit Phytohaemagglu- tinin (PHA) und Antigen	16
	7) In vitro-Versuche mit Chloroquin bzw. Kortikosteroiden	16
	8) Zusammenfassung	17
V.	UNTERSUCHUNG UND ERGEBNISSE	18
	1) Material und Methodik	18
	1.1 Wahl des Versuchstieres	18
	1.2 Entfernen der Behaarung	18
	1.3 Allergen	18
	1.4 Sensibilisierung	19
	1.5 Blutentnahme	19

II

1.6	Blutausstriche	20
1.7	Mikroskopische Untersuchung	21
1.8	Die einzelnen Versuchsreihen	21
1.9	Graphische Darstellung	23
2)	Ergebnisse	24
2.1	Gruppe I	24
2.1.1	Erfolgsreaktion	24
2.1.2	Azurgranulierte Lymphozyten	24
2.2	Gruppe II	27
2.2.1	Erfolgsreaktion	27
2.2.2	Azurgranulierte Lymphozyten	28
2.3	Gruppe III	31
2.3.1	Erfolgsreaktion	31
2.3.2	Azurgranulierte Lymphozyten	31
2.4	Gruppe IV	34
2.4.1	Erfolgsreaktion	34
2.4.2	Azurgranulierte Lymphozyten	34
2.5	Signifikanz	37
VI.	DISKUSSION	39
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	44
	Literaturverzeichnis	45

I. EINLEITUNG

Das allergische Kontaktekzem ist die klinische Manifestation einer kutan-epidermalen Überempfindlichkeit vom Spättyp. Bei seiner Entstehung sind die immunkompetenten Lymphozyten beteiligt. Diese Lymphozyten lassen sich von den nicht immunkompetenten Lymphozyten durch verschiedene Methoden unterscheiden, wie z.B. durch die In-vitro-Stimulationsversuche mit Antigen oder aufgrund der physikalischen Dichte (55). Allerdings sind diese Methoden kompliziert, aufwendig und zeitraubend. Sie eignen sich deshalb nicht für die tägliche Anwendung in der Praxis. Hierfür fehlt ein schnell durchführbarer Test, der anhand von morphologischen Kriterien eine zuverlässige Aussage über die Mengenverhältnisse von immunkompetenten und nicht immunkompetenten Lymphozyten im Blutserum und am Schockorgan erlaubt.

Auf der Suche nach einem solchen Test wurde das Verhalten der Blutlymphozyten bei allergischem experimentellen Kontaktekzem und toxischer Dermatitis der Meerschweinchen geprüft. Besonders interessierten die azurophilen Granula der Lymphozyten. Die Arbeitshypothese war, daß die azurophilen Granula der Lymphozyten als Kennzeichen der Immunkompetenz dieser Zellen gewertet werden können. Um dies zu beweisen, wurden die quantitativen Veränderungen der azurgranulierten Lymphozyten in den nach May-Grünwald-Giemsa gefärbten Blutaussstrichen im Verlaufe des Experimentes untersucht.

Vermehren sich die azurgranulierten Lymphozyten während eines Sensibilisierungsversuches, so weist dies auf einen Zusammenhang zwischen ihrem vermehrten Auftreten und der erfolgten Sensibilisierung hin. Die azurophilen Granula stellendann ein morphologisches Erkennungsmerkmal der immunkompetenten Zellen dar und können in einem einfachen labortechnischen Test zur Identifizierung solcher Zellen herangezogen werden.

II. LYMPHOZYTEN BEI KONTAKTEKZEM

1) Histologische Untersuchungen

Die Tatsache, daß die Lymphozyten bei Kontaktekzem eine wichtige Rolle spielen, ist schon seit vielen Jahren bekannt und wird durch neue Arbeiten immer wieder bestätigt. Die Bedeutung der Lymphozyten für die Pathogenese der Überempfindlichkeit vom Spättyp und somit auch für die des Kontaktekzems wird in den Vordergrund gestellt, gleichgültig, ob die histologischen, histochemischen oder andere Methoden angewandt werden. Bei den Dermatologen waren es besonders histologische Untersuchungen, die den ersten Aufschluß über die Zusammensetzung und Bedeutung des allergischen Infiltrates gaben.

Mehrere Arbeiten, die sich mit dem histologischen Bild des Kontaktekzems beschäftigen, finden wir bei Miescher (49). Sein bekannter vor mehreren Jahren ausgesprochener Satz hat heute noch allgemeine Gültigkeit, wenn er auch durch verschiedene Autoren Erweiterung, besonders in Bezug auf die Zusammensetzung des Infiltrates, erfahren hat: "Für das histologische Bild der ekzemallergischen Reaktion ist somit charakteristisch die umschriebene von unten aufsteigende lymphozytäre Spongiose, und ebenso charakteristisch ist die dominierende Rolle, welche von Beginn der Reaktion an die Lymphozyten spielen", wobei er sicherlich nicht nur die Histologie, sondern auch die Pathogenese des Kontaktekzems mit eingeschlossen meint. Miescher findet seine eigenen Ergebnisse an Untersuchungen anderer Autoren wie Brunn (16) und Nexmand (53) bestätigt. Diese haben das Verhältnis der Lymphozyten zu Granulozyten im histologischen Bild quantitativ ausgezählt und festgestellt, daß im Falle eines allergischen Kontaktekzems die Zahl der Lymphozyten bei weitem überwiegt, während bei einem toxischen Kontaktekzem sich dieses Verhältnis zu Gunsten von

Granulozyten verschiebt. Nexmand (53) fand, daß der Bläscheninhalt bei allergischen Ekzemen aus monozytären Zellen besteht, während bei toxischer Reaktion kaum mononukleäre Elemente zu finden sind.

Bei anderen Autoren wie Civatte (20) ist eine differenziertere Beurteilung des histologischen Bildes zu finden. Er spricht von Lymphozyten, Histiozyten und Monozyten, wobei er die letzteren auch in den stark umstrittenen "Vesiculettes primordiales" zu beobachten glaubt.

2) Histochemische Untersuchungen

Die Anwendung histochemischer Methoden im Gewebsschnitt machte es möglich, die einzelnen Zellen des allergischen Infiltrates besser zu differenzieren. Bandmann (4-6) wendet sich in seinen Arbeiten, wie er selbst sagt, gegen den zweiten Teil des von Miescher ausgesprochenen Satzes. Er hebt neben der Aufgabe der Lymphozyten die Aufgabe der Monozyten bei der Pathogenese des Kontaktekzems hervor. Bei experimentellem Kontaktekzem fand er in histologischen Schnitten unter Verwendung der Benzidinmethode reichlich peroxydase-positive Monozyten im Infiltrat.

Braun-Falco (15) und andere Autoren bezeichnen die im allergischen Infiltrat sich befindenden Zellen einfach als Rundzellen. Spier (60) schreibt, daß die Primärphase durch interzelluläres Ödem und das Einwandern der Rundzellen in die betroffenen Epidermisbereiche charakterisiert sei.

Turk (62,63) und Mitarbeiter beschreiben in ihrer histochemischen Untersuchung die Zusammensetzung des durch Applikation von verschiedenen Antigenen hervorgerufenen Hautinfiltrates und heben besonders das Auftreten von Makrophagen hervor. Sie weisen diesen eine wichtige Funktion bei der Überempfindlichkeit vom Spättyp zu. Es wird auch das gehäufte Vorkommen von Lysosomen in Makrophagen und Lymphozyten erwähnt.

Baun-Falco und Burg (15) beobachteten Makrophagen, Lymphozyten, peroxydase-positive Monozyten und wenig neutrophile Granulozyten in den Infiltraten.

3) Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Besser noch als die histochemischen, ermöglichen die elektronen-mikroskopischen Untersuchungen das genaue Unterscheiden einzelner Zelltypen im allergischen Hautinfiltrat. Hierbei wird besonders das Vorkommen von Monozyten und Gewebsmakrophagen neben Lymphozyten im Infiltrat der allergischen Epikutantestreaktion hervorgehoben (66).

4) Zusammenfassung

Die histologischen, histochemischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen, daß die Lymphozyten bei allergischem Kontaktekzem die wichtigste Aufgabe erfüllen. Aber auch Monozyten und Makrophagen sind an der Reaktion maßgeblich beteiligt.

Zusammenfassend ist die Histologie des allergischen Kontaktekzems in der frühen Phase durch ein intercelluläres Ödem und eine intra epidermale Bläschenbildung gekennzeichnet. Im Corium sind weite Kapillaren, perivaskuläres Ödem und rundzellige, in die Epidermis einwandernde Infiltrate zu sehen. Bei den Rundzellen handelt es sich um Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen, wie die Histochemie zeigt (14,49,60).

Das histologische Bild des allergischen Kontaktekzems beim Menschen und Meerschweinchen ist weitgehend gleich (49).

III. PATHOGENESE DER ÜBEREMPFINDLICHKEIT VOM SPÄTTYP

1) Aktive Sensibilisierung

Die ersten Versuche, das Kontaktekzem bei verschiedenen Tieren auf experimentellem Wege zu erzeugen, gehen auf CASH zurück (19). Die besten Ergebnisse werden nach epicutane oder intracutaner Verabreichung des Antigens erreicht. Versuche, durch intravenöse, intramuskuläre, subcutane und andere Art der Zufuhr des Allergens ein Kontaktekzem zu erzeugen, blieben erfolglos oder erwiesen sich als bedeutend schwächer. Aus den zahlreichen Arbeiten seien hier die von Landsteiner und seiner Schule (40) erwähnt, der sich in den dreißiger Jahren mit dem Problem der Kontaktüberempfindlichkeit eingehend befaßt hat. Zur Erzeugung des Kontaktekzems verwendete er die verschiedensten niedermolekularen Stoffe, wie z.B. Nickel, Arsen, Dinitrochlorbenzol, Diamethazon und Pikrylchlorid (41). In seinen Arbeiten sprach er die Vermutung aus, daß die niedermolekularen Stoffe in der Epidermis an Proteine gebunden werden (42). Erst dieser Komplex wird von dem Immunsystem als "nicht-selbst"-Struktur erkannt und mit Antikörperbildung beantwortet.

2) Beteiligung der regionären Lymphknoten

Auf welchen Wegen die spezifische Antwort weitergeleitet wird, untersuchten u.a. Wenk und Frey (26,27). Sie prüften die Dinitrochlorbenzol-Sensibilisierung bei Meerschweinchen an Hautexplantaten. Je nach Versuchsanordnung wurden die Nerven, Blutbahnen und Lymphbahnen sowie auch die zugehörigen regionalen Lymphknoten entfernt. Sie stellten fest, daß das Vorhandensein von Lymphbahnen und regionären Lymphknoten eine notwendige Voraussetzung der Immunantwort ist.

3) Passive Sensibilisierung

Versuche, die Überempfindlichkeit vom Spättyp auf andere Tiere oder Menschen zu übertragen, mißlangen anfangs ausnahmslos. Es gab zwar Arbeiten, die eine Übertragung mit Serum beschreiben, dies hat sich bei Kontrollversuchen aber als nicht zutreffend erwiesen (48).

1942 glückte es Landsteiner und Chase (42), Meerschweinchen passiv zu sensibilisieren. Sie verwendeten dazu die Zellen des Peritonealexsudates sensibilisierter Meerschweinchen. Es handelte sich also nicht um die im Plasma vorhandenen Antikörper wie bei der Überempfindlichkeit vom Soforttyp, sondern es waren zelluläre Elemente, vorwiegend Lymphozyten, die die spezifische Reaktion hervorgerufen haben. Zahlreiche Arbeiten verschiedener Autoren bestätigen diese Tatsache. Zur passiven Übertragung können Homogenate aus Milz- und Lymphknotenzellen, Ductus thoracicus-Zellen, Lymphozyten des Blutes sowie Peritonealexsudatzellen herangezogen werden. Die passive Übertragung eröffnete ein breites Feld für weitere experimentelle Arbeiten, so z.B. mit radioaktiv markierten Zellen.

Najarian und Feldmann (51) verwendeten Immunzellen, die mit tritiummarkiertem Thymidin gekennzeichnet waren. Im Bereich der Erfolgsreaktion konnte beim passiv sensibilisierten Tier eine signifikante Ansammlung von radioaktiven Immunzellen festgestellt werden. Da Zweifel an diesem Experiment auftraten (52), führten Najarian und Feldmann eine Sensibilisierung mit Dinitrofluorbenzol bzw. Tuberkulin durch. Sie markierten nur die Zellen des tuberkulin-überempfindlichen Tieres, nicht dagegen die des Tieres, das gegen DNFB überempfindlich war. Sie injizierten ein Gemisch von markierten und nicht markierten Zellen, lösten eine Hautreaktion mit PPD aus und konnten im autoradiographischen Bild eine deutliche Anhäufung von radioaktiven Immunzellen beobachten. Die Hautreaktion mit DNFB ergab keine Ansammlung der markierten Zellen.

4) Transferfaktor

Die experimentellen Untersuchungen an Mensch und Tier zeigten einerseits eine große Übereinstimmung der Ergebnisse, andererseits wurden gravierende Unterschiede festgestellt. Beispielsweise hält die passive Sensibilisierung beim Tier meist nur Tage, beim Menschen dagegen Monate oder sogar Jahre an. Die Menge der zur Sensibilisierung benötigten Extrakte ist beim Menschen kleiner. Als eine der wichtigsten Abweichungen ist die Möglichkeit der passiven Übertragung mit dem sog. Transferfaktor zu werten, die bisher nur beim Menschen gelungen ist. Dieser Faktor wurde durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen aus dem peripheren Blut gewonnen. Die chemische Form ist bisher unbekannt. Wahrscheinlich handelt es sich nicht um eine Antikörperstruktur, denn die so übertragene Überempfindlichkeit hält sehr lange Zeit an, ca. 2 Jahre.

Als Grund, warum nur beim Menschen die passive Sensibilisierung mit Transferfaktor möglich ist, wird die Tatsache angesehen, daß das menschliche Immunsystem am besten entwickelt ist (61).

5) Lymphozyt als immunkompetente Zelle

Von Medawar (46,47) ist der Begriff "immunologisch kompetente Zelle" geprägt worden. Diese Zellen antworten auf eine "nicht selbst" Struktur mit einer spezifischen Reaktion. Aufgrund der experimentellen Arbeiten hat er angenommen, daß es sich hier um Lymphozyten handelt.

Die Lymphozyten sind aber nicht homogen. Zunächst kann zwischen kleinen und großen Lymphozyten unterschieden werden (32). Die großen mit einem Durchmesser von 10-16 μ haben einen ovalen, stark gefärbten Kern. Das Protoplasma ist homogen und enthält manchmal azurophile Granula. Die kleinen Lymphozyten haben einen Durchmesser von 6-10 μ

und bestehen eigentlich nur aus Zellkern, der stark und ungleichmäßig gefärbt ist. Um den Kern herum liegt ein schmaler Protoplasmasaum. Granula sind nur manchmal und spärlich zu finden. Es liegt die Vermutung nahe, daß die kleinen Lymphozyten die Immunzellen sind. Unter diesen sind Kurz- und Langlebige zu finden. Die Langlebigen lassen sich besser verfolgen und sind vermutlich auch wichtiger. Die Lebensdauer soll zumindest beim Menschen mehrere Jahre, evtl. Jahrzehnte betragen (33). Sie entwickeln sich aus den Stammzellen des Knochenmarks. Die Fähigkeit, fremde Strukturen zu erkennen, "selbst" und "nicht selbst" zu unterscheiden, erwerben sie erst im Thymus (22). Hier entstehen die sog. T-Lymphozyten bzw. Thymozyten. Thymusaplasie beim Menschen ist gleichbedeutend einem Ausfall der Immunabwehr (28). Neonatal thymektomierte Mäuse entwickeln nach einer späteren Thymusimplantation nahezu normale immunologische Reaktionsfähigkeit. Die Thymusdrüse bzw. ein im Thymus produzierter Stoff ermöglicht die Entwicklung von Stammzellen zu immunologisch kompetenten Zellen (33). Diese zirkulieren ebenso wie die B-Lymphozyten durch den Körper und suchen das Gewebe nach Antigenen ab. Wird eine "nicht selbst" Struktur entdeckt, dann siedeln sich diese Zellen im regionalen Lymphknoten an. Ob sie von der Fremdstruktur angezogen werden oder ob es sich um ein zufälliges Treffen handelt, ist unbekannt. Ebenso unklar ist, wie diese Struktur erkannt wird. Manche Untersuchungen sprechen dafür, daß auf der Zelloberfläche der immunologisch kompetenten Lymphozyten sich Strukturen befinden, die dem Antigen entsprechen (46).

6) Klonale Selektionstheorie

Die klonale Selektionstheorie (17,18) geht von der Annahme aus, daß für jedes Antigen schon von vornherein eine immunologisch kompetente Zelle angelegt ist. Damit also die Überempfindlichkeitsreaktion anlaufen kann, muß es zu einer Begegnung zwischen einer ganz bestimmten Zelle mit einem ganz bestimmten Antigen kommen. Aus dieser Zelle entwickelt sich dann ein Klon, der die Immunantwort auslöst.

7) Entwicklung der Gedächtniszellen

Der immunologisch kompetente Lymphozyt ist in der paracorticalen Zone (Tertiärknoten) des regionären Lymphknotens zu finden (63). Es besteht also auch eine räumliche Trennung von den Antikörper produzierenden Plasmazellen, die in den Sekundärknoten liegen.

In den nächsten 2-6 Tagen nach dem Eindringen des Antigens in die Epidermis kommt es zu einer deutlichen Vergrößerung und Gewichtszunahme des betreffenden Lymphknotens. Mikroskopisch wird eine Proliferation der Tertiärknoten sichtbar. Bei ca. 10 % der Zellen handelt es sich um sog. pyroninophile Zellen, die eine starke Proteinsynthese aufweisen. Später werden diese durch kleine Lymphozyten abgelöst. Es könnte sich um Abkömmlinge der pyroninophilen Zellen oder um neu eingewanderte Lymphozyten handeln. Ab dem 6. bis 9. Tag ist die allergische Reaktion voll ausgeprägt (44). Die Reaktion beschränkt sich nicht auf den entsprechenden regionalen Lymphknoten, sondern es kommt zu einer Generalisierung, wobei die Intensität mit der Entfernung abnimmt.

Aus einer oder einzelnen Immunzellen entwickeln sich die Gedächtniszellen (Memory-cells), die für die Sekundärantwort verantwortlich gemacht werden. Sie dienen der erneuten Erkennung der "nicht-selbst"-Struktur und lösen die Reaktion, die wir später als das Bild der Kontaktdermatitis vor uns haben, aus. Zu dieser kommt es nach ca. 6 Tagen. Das ist offensichtlich die Zeit, die zur Ausreifung der Immunocyten nötig ist (45).

8) Beziehungen zwischen Lymphozyten und Makrophagen im allergischen Infiltrat

Die Zusammensetzung des allergischen Infiltrates wurde oben erwähnt (II 4.) Das Infiltrat besteht nicht nur aus Lymphozyten, sondern diese stellen einen Anteil dar, der

quantitativ gesehen nicht der größte ist. Andererseits wird den Lymphozyten die wichtigste Aufgabe bei dem allergischen Kontaktekzem zugeschrieben. Es ergibt sich die Frage, ob und wie die anderen zellulären Elemente des allergischen Infiltrates von den Lymphozyten in ihrem Verhalten beeinflußt werden.

Eine teilweise Antwort auf diese Frage haben die in-vitro-Versuche gegeben, wo sich zeigt, daß unter bestimmten Bedingungen die Makrophagen in ihrer Beweglichkeit gehemmt werden, aber nur dann, wenn der Zellkultur kleine Lymphozyten, also Immunozyten und das spezifische Antigen beige-mischt sind (11,12). Verantwortlich dafür wird der sog. "migration inhibition factor" gemacht, der offensichtlich von den Lymphozyten produziert wird.

Noch ein anderes Modell gibt Aufschluß über das Zusammenwirken der Lymphozyten und Makrophagen im allergischen Infiltrat. In einer besonders vorbereiteten Zellkultur werden die als Antigen verwendeten Zellen zerstört. Das geschieht so, daß die Lymphozyten und Makrophagen die fremden Zellen angreifen und deren Zellwand schädigen. Dies führt die Lysis dieser Zellen herbei. Makrophagen allein zeigen diese Eigenschaft wiederum nicht, sondern die Gegenwart der Lymphozyten ist erforderlich. Dieses Phänomen wird "target cell destruction" oder "Zielzellzerstörung" genannt (56).

Andererseits gibt es Phasen im allergischen Geschehen, in denen die Makrophagen wahrscheinlich eine primäre Aufgabe haben. Es wird zur Zeit diskutiert, daß sie an der Zubereitung des Antigens am Orte des Eindringens, am Transport zum regionalen Lymphknoten, an der Speicherung des Antigens, an der Weitergabe der Struktur an die Lymphozyten beteiligt sind. Entsprechende experimentelle Arbeiten liegen bereits vor (5,13,14,54).

Eine scharfe Trennung und Abgrenzung der Funktionen, die die Lymphozyten und Makrophagen innehaben, ist aufgrund der bisherigen Kenntnisse nicht möglich. Die Hypothese, daß die Lymphozyten als einzige Zellart die allergische Reaktion bestimmen (45), erweist sich durch die gegenteiligen Arbeiten als nicht haltbar oder zumindest als zweifelhaft.

IV. AZUROPHILE GRANULA

1) Geschichtliches

Werden die Blutaussstriche nach May-Grünwald-Giemsa-Methode gefärbt, können bei einem Teil der Lymphozyten Einschlüsse im Cytoplasma beobachtet werden. Es handelt sich um azurophile Granula.

Diese Zelleinschlüsse, da mikroskopisch gut sichtbar, wurden bereits Anfang des Jahrhunderts entdeckt und sorgfältig beschrieben (50). In den folgenden Jahrzehnten wurde den Lymphozyten, ihrer Eintönigkeit wegen, wenig Bedeutung beigemessen und so finden sich auch keine Hinweise auf azurophile Granula in der Literatur. Die ersten Arbeiten nach dem Kriege stammen von Begemann (8,9) und Gleiss (29). Begemann beschreibt das Verhalten der azurophilen Lymphozyten nach parenteraler Antigenverabreichung. Gleiss beschäftigt sich viel mit diesem Thema, wobei die Verhältnisse im Säuglings- und Kindesalter besonders interessierten (29,30).

Über die Beziehung zwischen Gamma-Globulinen und azurophilen Granula arbeiteten mehrere Gruppen, da die Annahme bestand, daß die Lymphozyten neben Plasmazellen an der Antikörperbildung beteiligt sein würden (3,38,58). Verlauf der Azurophilie bei Hepatitis, Mononucleosis infectiosa und anderen infektiösen Erkrankungen beschrieb u.a. Clemenson (21). Über azurophile Granula bei Frühgeburten und bei Infektionskrankheiten im Kindesalter, Masern, Pertussis, berichtete wiederum Gleiss (30). Im Jahre 1969 erschien eine zusammenfassende Arbeit, in der vorgeschlagen wurde, die azurophile Granula als Merkmal zur Erkennung von Antikörper bildenden Lymphozyten zu benutzen (31). Eine breite Darstellung der Forschungsergebnisse im licht-, phasenkontrast- und elektronen-mikroskopischen Bereich ist bei Gordon (32) zu finden. Die histochemische Methode wird ebenfalls abgehandelt.

2) Morphologie im Lichtmikroskop

Azurophile Granula sind die einzigen auffallenden Strukturen des sonst recht eintönigen Cytoplasmas der Blutlymphozyten. Den Namen verdanken sie der strahlenden rot-violetten Farbe, die in gut gefärbten Ausstrichen im Lichtmikroskop zum Vorschein kommt. Die Farbsintensität kann von Zelle zu Zelle schwanken. Die Form ist rund bis oval, die Größe beträgt zwischen 0,2 bis 0,4 μ (64,32). Meist finden sich pro Zelle 5-40 solcher Granula.

Nicht in allen Lymphozyten können sie beobachtet werden. Auch Schwankungen mit dem Lebensalter werden angegeben. Bei Kindern bis zu 14 Jahren finden sich bei ca. 5 %, im Erwachsenenalter bei 5-10 % der Blutlymphozyten azurophile Granula (66, 31). Andere Autoren geben 15 % an (11). Meist handelt es sich um "große" Lymphozyten mit hellem Plasma. Aber auch in den "kleinen" werden sie gesehen.

Ähnlich wie es im Laufe des Lebens zum Anstieg der azurophilen Lymphozyten kommt, kommt es zum Anstieg im Krankheitsfalle. Diese Änderung ist aber wesentlich ausgeprägter. Bei Hepatitis, Mononucleosis infektiosa, Typhus und Paratyphus wird eine deutliche Zunahme beobachtet. Gleichzeitig erfahren einzelne Zellen Vermehrung und Vergrößerung der Granula (21).

Ebenso führen die infektiösen Erkrankungen im Kindesalter - Keuchhusten, Masern - zu einem Anstieg. Der Verlauf ist etwa so, daß es zunächst über einen Zeitraum von 10-20 Tagen zu einer langsamen Zunahme kommt. Nachdem das Maximum erreicht ist, das zwischen 25 und 60 % liegt, was teilweise dem 10-fachen der Norm entspricht, pflegt ein langsamer Abfall zum Ausgangswert einzusetzen. Bei manchen Erkrankungen ist der Verlauf zweigipflig (31).

Parenterale Antigenverabfolgung ruft eine deutliche Zunahme der azurophilen Lymphozyten hervor. Die höchsten Werte sind nach 15 Tagen zu beobachten, jedoch nur im Blut und nicht im Knochenmark (8). Ein Unterschied in der Prozentzahl zwischen venösem und kapillarem Blut wurde nicht festgestellt (7).

Das Bekanntwerden des Anstieges der "Azurophilen" bei verschiedenen Infektionskrankheiten warf die Frage nach der Beziehung der Granula zu spezifischer Eiweißsynthese auf. Wie die meisten Arbeiten ergaben, ist ein direkter Zusammenhang zwischen Erhöhung der Gamma-Globuline und dem Anstieg der azurophilen Lymphozyten nicht anzunehmen. (31,38,58). Es gibt jedoch auch gegenteilige Ergebnisse (3). Auch bei malignen Tumoren und Leukosen wurden keine Parallelen gefunden. Auffällig waren dabei die hohen Zahlen von azurophilen Lymphozyten bei Leukosen (38).

3) Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen

Diese Methode, mit der es möglich geworden ist, lebende Zellen zu beobachten, zeigt, daß sich offensichtlich in allen Lymphozyten Strukturen auffinden lassen, die in Größe und Form den azurophilen Granula entsprechen. Meist sind es 5-15 Stück pro Zelle, die Größe schwankt zwischen 0,2 bis 0,4 μ . In manchen Lymphozyten sind sie besonders auffallend (32). Die Anwendung von Fluoreszenzverfahren, die ebenfalls Beobachtung lebender Zellen erlauben, ergeben Anwesenheit von Granula in allen Lymphozyten (2).

4) Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Elektronenmikroskopisch dargestellt werden im Cytoplasma elektronendichte, runde bis ovale Körperchen beschrieben, deren Größe 0,1 bis 0,5 μ beträgt. Sie besitzen eine einfache Außenmembrane und haben meist keine erkennbare innere Struktur, sind homogen. Der Elektronendichte wegen werden sie auch "dense bodies" genannt (64). Bei einigen kann ein lamellärer oder granulärer Aufbau beobachtet werden. Von den Microbodies sind sie deutlich zu unterscheiden. Manchmal entsteht der Eindruck, als würden sie in Verbindung zu Golgi-Apparat stehen.

Nicht in allen Lymphozyten werden sie gesehen (32,64), was andere Autoren jedoch auf ungünstige Schnittlegung zurückführen (32).

Diese Plasmaeinschlüsse werden Lysosomen bzw. Zytosomen genannt.

5) Histochemische Untersuchungen

Diese zeigen, daß Lysosomen der Lymphozyten vorwiegend hydrolytische Enzyme enthalten. Am stärksten vertreten ist die saure Phosphatase und Beta-Glukuronidase. Aber auch andere werden nachgewiesen, z.B. Ribonuclease und Desoxyribonuclease. Die Verteilung und die Stärke der Reaktion bei den beiden erstgenannten Enzymen ist ähnlich, wobei große Lymphozyten beträchtlich mehr als kleine enthalten. (1,64). Das markanteste Enzym ist saure Phosphatase. Joshi (39) fand saure Phosphatase-Aktivität bei 1/3 der Lymphozyten. Andere Autoren bei 60 % (57). Im Gegensatz dazu berichtet Ackermann (1), in allen Zellen Aktivität beobachtet zu haben.

6) Stimulationsversuche mit Phytohaemagglutinin (PHA) und Antigen

Interessante Ergebnisse zeigen in vitro Versuche mit PHA und Antigen. Von der Fülle dieser Arbeiten sei nur auf die von Hirschhorn (35) und Fischer und Group (24) hingewiesen. Bei den mit PHA stimulierten Lymphozyten kommt es zur Vermehrung der Lysosomen, wobei der Aktivitätsanstieg der Enzyme mit histochemischer Methode gut demonstriert werden kann. Ähnliches kann durch Stimulation mit Antigenen erreicht werden, nur ist die Anzahl der stimulierten Lymphozyten geringer. (35,36,55)

7) In vitro-Versuche mit Chloroquin bzw. Kortikosteroiden

In vitro-Versuche haben gezeigt, daß die Zellkulturen, die mit Chloroquin vorbehandelt wurden, nicht auf PHA-Stimulation ansprechen (25).

Ähnlich können die Toxine, wie z.B. Endotoxin, Streptolysin, Typhusvakzine u.a. in ihrer Wirkung durch Kortikosteroide gehemmt werden. Ob diesen beiden Phänomenen derselbe Mechanismus zugrunde liegt, ist nicht mit Sicherheit zu sagen. Es wird aber angenommen, daß durch Chloroquin bzw. Kortikosteroide die Lysosomenmembran der Zellen stabilisiert und dadurch die Freisetzung der hydrolytischen Enzyme verhindert wird (37). Sollte sich diese Annahme bewahrheiten, würde es bedeuten, daß die Lysosomen eine Schlüsselstellung im immunologischen Geschehen einnehmen.

8) Zusammenfassung

- a) In May-Grünwald-Giemsa-Färbungen enthalten 5-20 % der Blutlymphozyten azurophile Granula.
- b) Bei bestimmten Erkrankungen kommt es zum starken Anstieg der azurophilen Lymphozyten, der von der Vergrößerung und Vermehrung der Granula in der Zelle begleitet wird.
- c) Eine Korrelation zwischen Gamma-Globulin-Anstieg und Vermehrung von azurophilen Lymphozyten im Krankheitsverlauf scheint nicht zu bestehen.
- d) Azurophile Granula der Lymphozyten werden von verschiedenen Autoren als identisch mit den Lysosomen angesehen.
- e) Lysosomen enthalten hydrolytische Enzyme, vor allem saure Phosphatase, Beta-Glukuronidase, Ribonuclease, Desoxyribonuclease und andere mehr.
- f) PHA und Antigen stimulierte Lymphozyten enthalten wesentlich mehr Lysosomen als unstimulierte. Entsprechend ist die Aktivität der Enzyme erhöht.
- g) Die Lysosomenmembran läßt sich durch Glukokortikoide und Chloroquin stabilisieren.

V. UNTERSUCHUNG UND ERGEBNISSE

1) Material und Methodik

1.1 Wahl des Versuchstieres

Zur Erzeugung eines experimentellen Kontaktekzems wurden 40 männliche Meerschweinchen mit einem Durchschnittsgewicht von 400 g herangezogen. Die Sensibilisierung führt bei diesen Tieren zu einem fast 100 %igen Erfolg (26). Das Alter der Tiere wurde so gewählt, daß ein vollentwickeltes Immunsystem angenommen werden darf. Sie wurden zu fünf in Käfigen gehalten und erhielten die übliche Meerschweinchennahrung. Zur Erkennung wurden sie mit fünf verschiedenen Farben gekennzeichnet. Die Markierung wurde bei Bedarf erneuert. Dreimal im Verlauf des Versuches wurden sie mit einer Küchenwaage gewogen. Von den 40 Tieren starb eines gegen Ende der Versuchsreihe.

1.2 Entfernen der Behaarung

Die Behaarung am Bauch oder den Flanken der Tiere haben wir mit einer Schermaschine (1/20 mm) entfernt. Erneute Rasur wurde vorgenommen, sobald die nachwachsenden Haare das Eindringen des Allergens erschwerten. Eine mechanische Hautirritation wurde sorgfältig vermieden. Dieser Methode wurde der Vorzug gegeben, da sie sich als wesentlich schonender als chemische Epilation erwies (26,44).

1.3 Allergen

Verwendet wurde das Dinitrochlorbenzol. Es handelte sich um alkoholische Lösungen von verschiedener Konzentration zwischen 0,03 und 5 %, je nachdem, ob eine allergische oder eine toxische Reaktion hervorgerufen werden sollte. Die jeweils benötigte DNCB-Menge wurde an einer Mikrowaage abgewogen und anschließend unter ständigem Mischen

mit einem Floh in Lösung gebracht. Bei Herstellung von 5 %igen Lösungen wurden diese erwärmt, um eine bessere Löslichkeit zu erreichen. 98 %iger Alkohol wurde mit einer 10 ml Pipette abgemessen, wobei eine entsprechende Korrektur zwischen Milliliter und Gramm vorgenommen wurde.

1.4 Sensibilisierung

Die entsprechend konzentrierte DNCB-Lösung wurde mit einer Tuberkulinspritze auf die rasierte Hautstelle getropft und die Flüssigkeit mit einem stumpfen Glasstab leicht eingerieben. Das Auftragen von Antigen erfolgte ein- bis zweimal täglich über einen Zeitraum von 5-9 Tagen oder bis zum Auftreten einer Hautrötung, die als Erfolgsreaktion gewertet wurde. Als Anhaltswerte dienten die Angaben von Frey und Wenk (26) sowie von Macher (44).

1.5 Blutentnahme

Das Blut für die Ausstriche wurde aus dem Ohr der Meerschweinchen entnommen. Die Haut wurde dabei mit einer Haemostilette fein durchtrennt. Mechanische Manipulationen wurden soweit wie möglich vermieden. Diese Art der Entnahme ist für die Meerschweinchen am schonendsten.

Zwischen venösem und art.Blut wurde aufgrund des Vorversuches nicht unterschieden. In dem Vorversuch (Tab.1) wurde bei 4 unbehandelten Tieren an 2 Tagen gleichzeitig Herzblut und venöses Ohrblut entnommen und verglichen.

Tabelle 1: Vergleich zwischen Herzblut und Ohrblut

Meerschwein- chen	Ohr 3.Tag	Herz	Ohr 4.Tag	Herz
1.	4	3	5	3
2.	4	4	6	7
3.	6	7	3	5
4.	7	8	8	7

Nachdem die Mengenverhältnisse der azurgranulierten Lymphozyten bei beiden Arten der Entnahme gleich waren, wurde auf die Herzpunktion verzichtet, u.a. um der Gefahr des Sekundenherztodes auszuweichen. Auch die anderen Möglichkeiten der Blutentnahme z.B. aus dem retrobulbären Plexus zeigten gegenüber der einfachen Abnahme am Ohr keinerlei Vorteile.

1.6 Blutausstriche

Diese wurden nach der üblichen labortechnischen Methode angefertigt. Die Ausstrichtechnik, die entscheidend für die Qualität der Präparate ist, mußte anfangs eingeübt werden. Wichtig ist, daß diese nicht zu dick sind. Die Präparate wurden nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt. Um möglichst frische, niederschlagsfreie Färbelösungen zu haben, wurden diese alle 4 Tage erneuert. Die Färbezeiten waren kürzer als sonst üblich : Es wurde 5 Min. lang mit Giemsa-Lösung fixiert und 15 Minuten lang mit May-Grünwald-Lösung gefärbt. Zu diesem Zeitpunkt sind die Lymphozytenkerne noch blaß und verdecken nicht die leuchtend rot dargestellten Lysosomen. Zu dunkle Präparate wurden 3 Minuten lang mit Phosphatpuffer entfärbt. Damit war eine gleichbleibende Qualität der Ausstriche gegeben.

1.7 Mikroskopische Untersuchung

Ein Zeissmikroskop mit Ölimersion diente zur Auszählung. Gezählt wurden stets 100 Lymphozyten, so daß die Anzahl der Azurgranulierten gleichzeitig eine Prozentangabe darstellte. Bei Präparaten, die einen deutlichen Unterschied zum Vortage aufwiesen, wurden, um ein genaues Ergebnis zu erzielen, 200 Lymphozyten ausgezählt. Um Fehler durch zu starke Ermüdung zu vermeiden, wurden höchstens 10 Ausstriche auf einmal beurteilt.

Die Erkennung von kleinen Lymphozyten war einfach, vorausgesetzt, es handelte sich um dünne und nicht zu lange gefärbte Präparate. Schwieriger war die Unterscheidung zwischen den großen Lymphozyten und den Monozyten. Beide Zellarten enthalten azurophile Granula. Bei unvorbehandelten Tieren waren die morphologischen Unterschiede klar. Später, nach Pinselungen mit DNCB-Lösung, traten große runde Zellen auf, die einen ovalen, blau-violetten, gleichmäßig gefärbten, randständigen Kern hatten. Das Plasma war hellblau, homogen und enthielt azurophile Granula. Die Kern-Plasma-Relation war 1:2 bis 1:3. Aufgrund der beschriebenen morphologischen Zeichen wurden diese neu aufgetretenen Zellen zu den großen Lymphozyten gerechnet.

1.8 Die einzelnen Versuchsreihen

Die 40 männlichen Meerschweinchen wurden in 4 Gruppen mit je 10 Tieren eingeteilt und mit verschiedenen konzentrierten DNCB-Lösungen behandelt.

1. Versuchsreihe

- a) Normalwerte: Nach entsprechender Vorbereitung, Bezeichnung usw. wurde an 5 Tagen die Zahl der azurophilen Lymphozyten auf 100 Lymphozyten bei nicht behandelten Tieren bestimmt.

- b) Sensibilisierung: Nach dem Rasieren des Bauches wurden bis zum 15. Tage Pinselungen mit 0,1 %iger DNCB vorgenommen. Bis zum 18. Tage erfolgte die Bestimmung der azurgranulierten Lymphozyten.
- b) Erfolgsreaktion: Diese wurde am 18. Tag mit 0,05 %iger DNCB-Lösung vorgenommen, die azurophilen Lymphozyten am 19. und 20. Tage ausgezählt.
- d) Toxische Behandlung: Diese wurde mit 5 %iger DNCB-Lösung am 20. Tag vorgenommen, die Lymphozyten an weiteren 6 Tagen ausgezählt.

2. Versuchsreihe

- a) Normalwerte: An 2 Tagen wurden azurophile Lymphozyten bei unbehandelten Tieren bestimmt.
- b) Sensibilisierung: Am 2. bis 10. Tag wurde 2mal täglich an 2 verschiedenen Körperstellen 0,15 %ige DNCB-Lösung aufgetragen. Bis zum 13. Tag erfolgte die Auszählung der azurophilen Lymphozyten.
- c) Erfolgsreaktion: Diese wurde mit 0,05 %iger DNCB-Lösung am 13. Tag ausgelöst.
- d) Toxische Behandlung: Diese wurde mit 5 %iger DNCB-Lösung am 15. Tag durchgeführt. Die Auszählung der azurophilen Lymphozyten erfolgte am 25. und 26. Tage.
- e) Erfolgsreaktion: Diese wurde anschließend mit 0,03 %iger DNCB-Lösung hervorgerufen.

3. Versuchsreihe

- a) Normalwerte: Diese wurden an 5 Tagen ermittelt.
- b) Sensibilisierung: Die Pinselungen mit 0,1 %iger DNCB-Lösung wurden zweimal täglich längstens über 9 Tage durchgeführt. Die Hautrötung haben wir als ein Zeichen der erfolgten Sensibilisierung gewertet. Daraufhin wurden die Pinselungen abgebrochen. Die azurophilen Lymphozyten wurden bis zum 15. Tag ausgezählt.

- c) Erfolgsreaktion: Diese wurde mit 0,03 %iger DNCB-Lösung am 19.Tag ausgelöst und die Lymphozyten am 19., 20. und 21.Tag ausgezählt.

4. Versuchsreihe

- a) Normalwerte: Diese wurden bei 5 Tieren an 2 Tagen und bei 5 Tieren an 5 Tagen ermittelt.
- b) Toxische Behandlung: Bei allen Meerschweinchen erfolgte eine Behandlung mit 5 %iger DNCB-Lösung, die azurophilen Lymphozyten wurden bis zum 15.Tag bestimmt.
- c) Erfolgsreaktion: Diese wurde am 15.Tag mit 0,05 %iger DNCB-Lösung durchgeführt und die azurophilen Lymphocyten am 16. und 17.Tag ausgezählt.
- d) Toxische Behandlung: Diese nochmalige Behandlung mit 5 %iger DNCB-Lösung erfolgte am 18., die Auszählung am 22., 23. und 24. Tag bei allen Tieren.

1.9 Graphische Darstellung

Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen wurden graphisch dargestellt. Die x-Achse entspricht dabei den fortlaufenden Versuchstagen. Die y-Achse gibt die Zahl der azurophilen Lymphozyten wieder. Eingetragen wurde jeweils der niedrigste und der höchste Tageswert, die anderen Werte liegen dazwischen. Aus allen Tageszahlen wurde der Mittelwert gebildet, der aus der ausgezogenen Linie ersichtlich ist.

Die verschiedenen Behandlungsarten toxisch, allergisch usw. wurden durch verschiedene Schraffierung hervorgehoben, wobei für gleiche Behandlung die gleiche Schraffierung verwendet wurde.

2) ERGEBNISSE

2.1 Gruppe I

2.1.1 Erfolgsreaktion (Tab.2)

Nach der Behandlung mit 0,1 %iger DNCB-Lösung zeigten 4 der 10 Tiere eine positive und 4 eine stark positive Erfolgsreaktion. Bei zwei Meerschweinchen (Nr.4 und Nr.7) war keine Hautrötung zu sehen.

Tabelle 2: Erfolgsreaktion - ausgelöst am 18.Versuchstag

Meerschweinchen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Hautreaktion	++	+	+	0	++	+	0	+	++	++

2.1.2 Azurgranulierte Lymphozyten

1. Einzelergebnisse (Tab.3)

Wie Tab.3 zeigt, war bei den Meerschweinchen Nr.4 und Nr.7 kein signifikanter Anstieg der azurgranulierten Lymphozyten feststellbar. Auch die toxische Behandlung der Tiere führte zu keinem Anstieg. Entsprechend war die Erfolgsreaktion bei diesen zwei Meerschweinchen negativ (Tab.2). Bei den anderen Meerschweinchen, die eine positive Hautreaktion zeigten, ist die Zahl der azurgranulierten Lymphozyten während der Sensibilisierung deutlich gewachsen. Zwei der drei Tiere (Nr.1 + Nr.10), bei denen die azurgranulierten Lymphozyten am stärksten angestiegen sind, zeigten auch eine stark positive Hautreaktion.

Die anderen Meerschweinchen ließen einen so differenzierten Zusammenhang vermissen. Beispielsweise wurde bei Meerschweinchen Nr.6 eine stark positive Hautreaktion erwartet, da ein starker Anstieg der Azurophilen vorlag. Diese war aber nur einfach positiv.

Tabelle 3: Einzelergebnisse der Gruppe I

Tiere	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0	+							
1	4	4	3	5	6	6	6	4	9	11	6	8	14	13	14	29	28	29	30	28	30	31	28	+
2	3	2	2	3	2	6	7	10	6	5	5	10	13	21	20	14	10	15	17	17	16	15	14	15
3	5	6	4	2	6	3	4	12	4	9	11	12	11	13	14	18	18	19	18	12	12	10	16	20
4	3	3	4	5	4	5	5	8	6	4	6	8	9	15	8	8	8	8	8	8	9	9	10	10
5	7	4	4	6	4	4	6	14	6	13	10	13	13	16	17	18	18	17	13	13	11	12	15	16
6	6	10	6	3	7	8	8	10	11	15	15	18	21	21	29	29	30	32	34	34	34	34	33	34
7	10	11	7	10	14	9	11	14	14	8	13	13	19	21	20	19	16	16	17	18	18	17	16	12
8	6	7	7	8	10	6	5	7	10	9	9	10	10	10	10	13	14	14	16	18	18	19	20	21
9	2	4	2	5	4	4	5	3	1	7	7	8	14	14	13	14	15	13	10	12	11	10	13	20
10	9	6	9	3	7	5	7	15	23	13	16	21	23	25	26	29	30	29	30	30	30	30	34	34
Tage	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24

Pinselfungen mit * 0,1 % DNCB-Lösung
 o 0,05 % DNCB-Lösung
 + 5 % DNCB-Lösung

Das Pinseln mit toxischen DNBC-Dosen führte zu keiner Änderung der vorher erzielten Ergebnisse. Nur bei zwei Meerschweinchen (Nr.8 und Nr.9) stiegen die azurgranulierten Lymphozyten merklich an.

Der höchste erreichte Wert lag bei 34 % azurgranulierter Lymphozyten (Nr.6, Nr.10).

2) Mittelwerte (Abb.1)

Der Mittelwert der azurgranulierten Lymphozyten betrug bei unbehandelten Meerschweinchen 6 %.

Nach der Behandlung mit allergischen DNBC-Lösungen stieg die Mittelwertkurve auf 18 % an. Gleichzeitig wur-

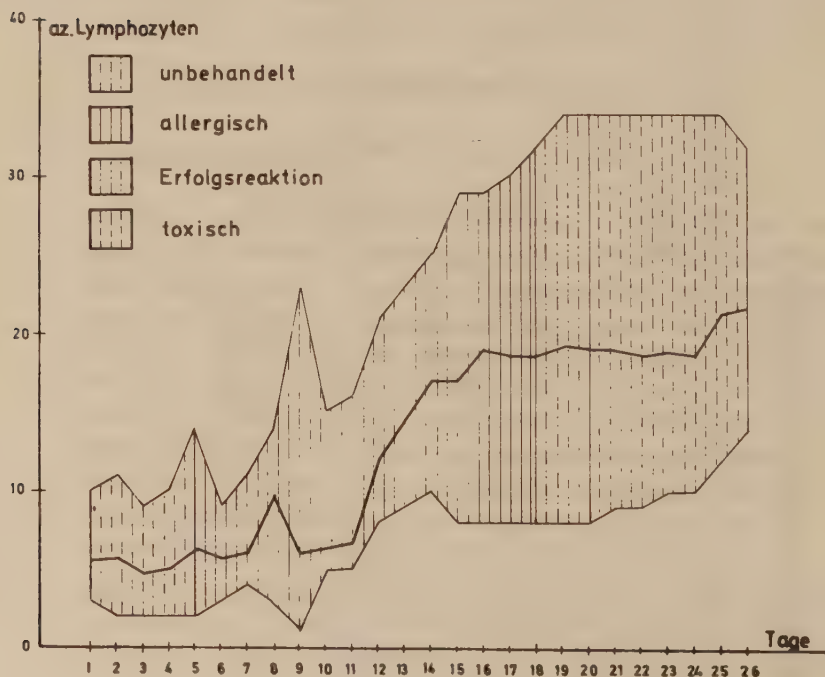


Abb.1 Mittelwertkurve, die niedrigsten und die höchsten Werte der azurgranulierten Lymphozyten bei der Gruppe I

den die Granula in den einzelnen Zellen zahlreicher und größer. Der Anstieg der azurgranulierten Lymphozyten begann am sechsten Tag nach dem ersten Kontakt mit dem Antigen. Die Mittelwertkurve verlief am steilsten zwischen dem sechsten und dem neunten Tag.

Die Erfolgsreaktion bewirkte keinen weiteren Anstieg der azurgranulierten Lymphozyten. Nach der toxischen Pinselung kam es zu einer geringen, nicht signifikanten Zunahme der azurgranulierten Lymphozyten.

Die absolut erreichten Werte lagen am Ende der Versuchsreihe zwischen 10 % und 34 %.

2.2 Gruppe II

2.2.1 Erfolgsreaktion (Tab. 4 und Tab.5)

1) Nach der Behandlung mit allergischen DNBC-Dosen war die Hautreaktion bei sieben Tieren positiv und bei zwei Tieren stark positiv. Bei dem Meerschweinchen Nr.6 war die Erfolgsreaktion nicht sicher zu beurteilen.

Tabelle 4: Erfolgsreaktion - ausgelöst am 13. Versuchstag

Meerschweinchen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Hautreaktion	+	+	+	+	+	?	++	+	+	++

2) Nach der anschließenden Pinselung mit 5 %iger DNCB-Lösung war eine positive Hautreaktion bei 6 Tieren zu sehen. 3 Meerschweinchen reagierten besonders stark. Außer den zwei Tieren, die zuvor schon eine starke Erfolgsreaktion zeigten, war es noch Meerschweinchen Nr.4, bei dem die Hauttestung zunächst nur einfach positiv ausfiel. Bei dem Meerschweinchen Nr.6 war die Reaktion negativ.

Tabelle 5: Erfolgsreaktion, ausgelöst am 26.Versuchstag

Meerschweinchen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Hautreaktion	+	+	+	++	+	0	++	+	+	++

2.2.2 Azurgranulierte Lymphozyten

1) Einzelergebnisse (Tab.6)

Die Hautreaktion bei dem Meerschweinchen Nr.6 war zuletzt negativ. Dieses Tier war also nicht sensibilisiert. Entsprechend sind die azurgranulierten Lymphozyten in diesem Falle nur geringfügig angestiegen, was wiederum auf ein gleichsinniges Verhalten der beiden Parameter, der Sensibilisierung und der azurgranulierten Lymphozyten schließen läßt.

Der Anstieg der azurgranulierten Lymphozyten war am größten bei den Tieren Nr.4, Nr.7 und Nr.10. Diese Meerschweinchen zeigten auch die stärkste Erfolgsreaktion. Bei den restlichen Meerschweinchen nahmen die azurgranulierten Lymphozyten im Laufe der Behandlung zu, erreichten aber nicht die Werte, die bei den drei oben angeführten Tieren festgestellt wurden. Auch die Erfolgsreaktion war hier nur einfach positiv.

Abweichend verhielt sich Meerschweinchen Nr.1, wo nur ein minimaler Anstieg sichtbar wurde, die Erfolgsreaktion aber positiv war. Der höchste Wert lag bei 34 % und wurde von 3 Tieren (Nr.4, Nr.7, Nr.10) erreicht.

2) Mittelwerte (Abb.2)

Die azurgranulierten Lymphozyten bei unbehandelten Tieren lagen zwischen 2 % und 8 %. Der Mittelwert betrug 5 %.

Nach den Pinselungen mit allergischen DNBC-Dosen stieg die Mittelwertkurve (ab dem dritten Tag) langsam an und erreichte nach 8 Tagen den Durchschnittswert von 19 %. Die nachfolgende Erfolgsreaktion sowie die toxische Behandlung führten zu keiner Änderung der Mittelwertkurve. Die abschließend festgestellten Werte lagen zwischen 11 % und 34 %.

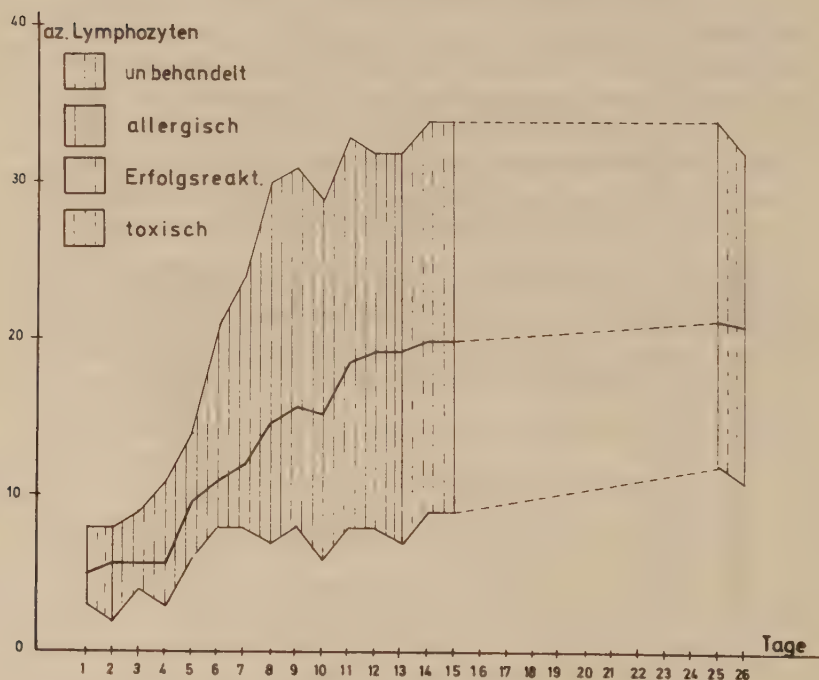


Abb.2: Mittelwertkurve, die niedrigsten und die höchsten Werte der azurgranulierten Lymphozyten bei der Gruppe II

2.3 Gruppe III

2.3.1 Erfolgsreaktion (Tab.7)

Nach längstens 9tägiger Behandlung der Meerschweinchen mit allergischen DNCB-Dosen wurde bei der anschließenden Erfolgsreaktion bei zwei Tieren eine fragliche, bei drei Tieren eine positive und bei vier Tieren eine stark positive Hautrötung beobachtet. Das Meerschweinchen Nr.7 zeigte keine Hautreaktion.

Tabelle 7: Erfolgsreaktion, ausgelöst am 19.Tag

Meerschweinchen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Hautreaktion	?	+	+	+	++	?	0	++	++	++

2.3.2 Azurgranulierte Lymphozyten

1) Einzelergebnisse (Tab.8)

Der Anstieg der azurgranulierten Lymphozyten bei dem Meerschweinchen Nr.7 war gering, die höchsten Zahlen lagen bei 16 %. Der geringe Anstieg entsprach auch der ausgebliebenen Erfolgsreaktion. Ebenfalls minimal war die Zunahme der azurgranulierten Lymphozyten beim Tier Nr.1 und Nr.6. Die erzielten Werte lagen unter 16 % und blieben deutlich unter dem sonst festgestellten Anstieg. Die Erfolgsreaktion war bei diesen Meerschweinchen fraglich positiv.

Bei den Tieren Nr.5, Nr.8, Nr.9 und Nr.10 konnten die Pinselungen schon vorzeitig, meist am 6.Tage abgebrochen werden. Die azurgranulierten Lymphozyten sind deutlich angestiegen und lagen um 30 %. Entsprechend war die Erfolgsreaktion stark positiv.

Tabelle 8: Einzelergebnisse der Gruppe III

Tiere	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
-------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

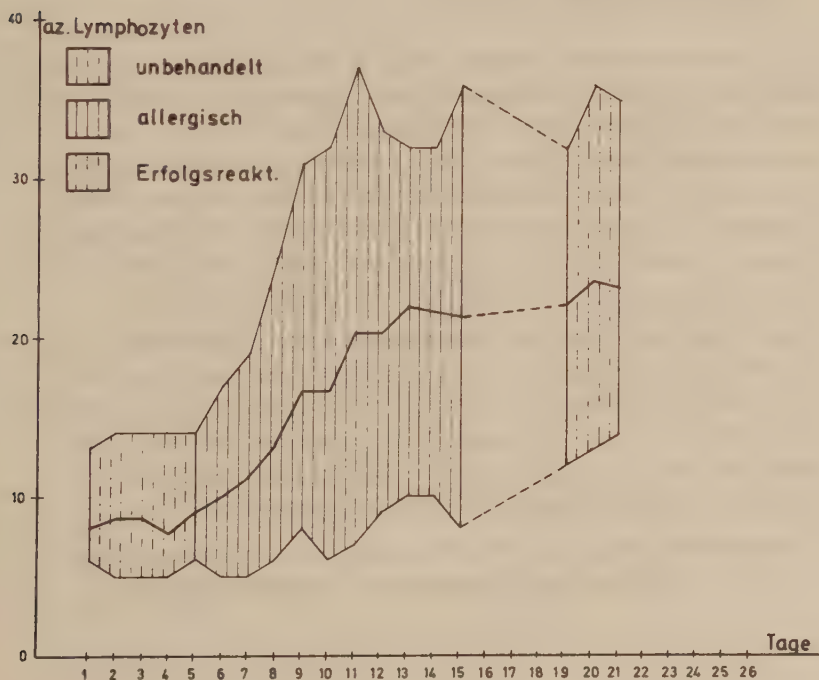
Pinselfungen mit * 0,1 % DNCB-Lösung
 o 0,03 % DNCB-Lösung
 + Abbruch der Pinselfung

Abweichend verhielten sich die Tiere Nr.3 und Nr.4. Bei dem ersten blieb die erreichte Lymphozyten-Veränderung hinter den Erwartungen. Im Verhältnis zu der positiven Erfolgsreaktion war der Anstieg der azurgranulierten Lymphozyten zu gering. Das andere Tier zeigte ein entgegengesetztes Verhalten. Die Zunahme der azurgranulierten Lymphozyten ist im Vergleich zu der nur einfach positiven Erfolgsreaktion zu stark.

Die in dieser Versuchsreihe beobachteten Höchstwerte an azurgranulierten Lymphozyten lagen bei 36 % (Nr.10).

2) Mittelwerte (Abb.3)

Die azurgranulierten Lymphozyten der nicht behandelten Tiere lagen bei 9 %. Sofort mit dem Beginn der Pinselungen stieg die Mittelwertkurve langsam und stetig an und erreichte nach 10 Tagen 21 %. Dieser, nach der Sensibilisierung eingenommene Wert hat sich durch die Erfolgsreaktion nicht geändert.



2.4 Gruppe IV

2.4.1 Erfolgsreaktion (Tab.9)

Im Anschluß an die Pinselungen mit 5 %iger DNBC-Lösung war die Erfolgsreaktion bei Meerschweinchen Nr.5 + Nr.7 einfach, bei allen anderen Tieren stark positiv. Verglichen mit den drei vorhergehenden Versuchsreihen war diese Behandlungsart am erfolgreichsten.

Tabelle 9: Erfolgsreaktion, ausgelöst am 15.Versuchstag

Meerschweinchen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Hautreaktion	++	++	++	++	+	++	+	++	++	++

2.4.2 Azurgranulierte Lymphozyten

1) Einzelergebnisse (Tab.10)

Bei dem Meerschweinchen Nr.7 wurde der geringste Anstieg der azurgranulierten Lymphozyten festgestellt. Gleichzeitig war die Erfolgsreaktion nur einfach positiv, was auf ein gleichsinniges Verhalten hinweist. Meerschweinchen Nr.2, Nr.4, Nr.5, Nr.6, Nr.8 und Nr.9 zeigten eine starke Zunahme der azurgranulierten Lymphozyten, die Einzelwerte lagen um 30 %, bei einer stark positiven Hautreaktion.

In den beiden gerade beschriebenen Fällen wird das parallele Verhalten der azurgranulierten Lymphozyten und der Hautreaktion deutlich. Das starke Ansteigen der Azurophilen läßt auf eine starke Erfolgsreaktion, schwaches Ansteigen auf eine schwächere Erfolgsreaktion schließen. Der Grad der Sensibilisierung drückt sich quantitativ in der Höhe der azurgranulierten Lymphozyten aus.

Abweichendes Ergebnis zeigte sich beim Meerschweinchen Nr.1, wo zunächst keine Zunahme der azurgranulierten

Tabelle 10: Einzelergebnisse der Gruppe IV

Tiere	+										0	+								
1		12	10	7	7	7	11	12	11	10	12	11	12	22	22	20				
2		13	17	19	20	29	27	28	26	29	21	34	38	22	26	26				
3		14	18	17	15	24	27	26	25	25	26	24	26	23	22	24				
4		12	14	14	9	10	9	13	17	17	18	24	33	37	42	40				
5		10	12	13	11	12	22	21	24	26	32	33	36	25	24	24				
6	10	8	9	10	12	17	20	28	24	28	34	31	30	28	25	30				
7	3	5	4	2	4	3	5	4	8	9	11	12	17	17	15	16				
8	8	9	8	7	8	9	11	10	12	13	23	26	28	32	34	33				
9	14	13	15	15	16	12	13	11	13	14	17	17	26	28	28	29				
10	13	13	14	15	14	16	15	17	18	20	27	25	20	23	24	22				
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		22	23	24	Tage

Pinselfungen mit + 5,0 % DNCB-Lösung
 o 0,05 % DNCB-Lösung

Lymphozyten zu sehen war, obgleich die Hautreaktion stark positiv ausfiel. Die erneute toxische Behandlung ließ die azurgranulierten Lymphozyten ansteigen.

In dieser Versuchsreihe ist der höchste überhaupt erreichte Wert gezählt worden - 42 % der Lymphozyten enthielten azurophile Granula (Nr.4) .

2) Mittelwerte (Abb.4)

Vor der Sensibilisierung enthielten 12 % der Lymphozyten azurophile Granula. Zehn Tage nach der Pinselung lagen die Mittelwerte bei 27 %, wobei der Anstieg langsam erfolgte. Die Hautreaktion und die darauffolgende zweite toxische Behandlung haben keine Verlaufsänderung der Mittelwertkurve herbeigeführt. Die azurgranulierten

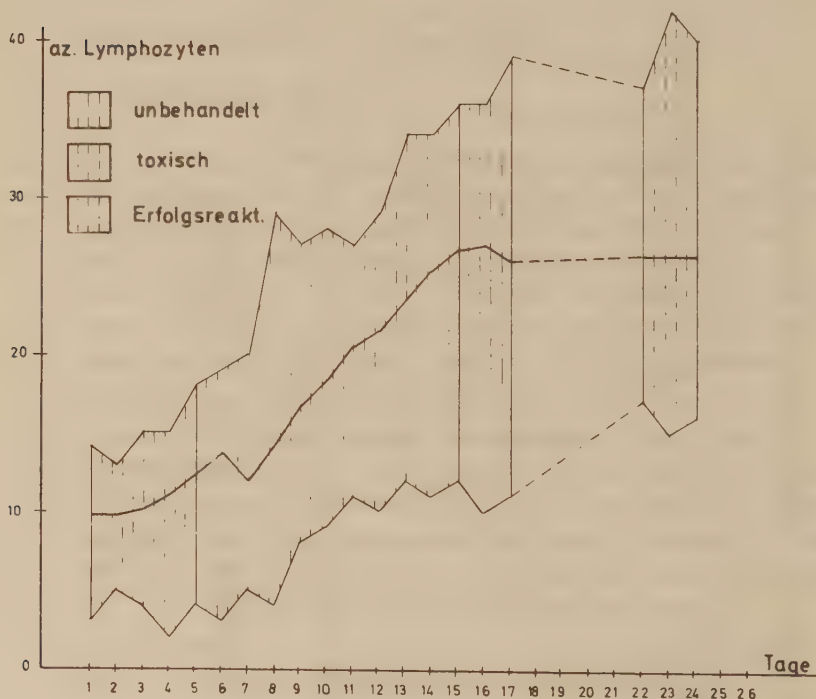


Abb.4: Mittelwertkurve, die niedrigsten und die höchsten Werte der azurgranulierten Lymphozyten bei der Gruppe IV

Lymphozyten sind auf das 2,2fache des Ausgangswertes angestiegen.

2.5 Signifikanz

Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde nach dem "Zeichen-Rangsummen-Test für gleichartige Paare" berechnet (65). Da der Verteilungstyp nicht bekannt ist und der Vergleich am gleichen Tier gemacht wurde, eignet sich der Wilcoxon-Test besonders gut für die Signifikanzberechnung.

- a) zu V. 2.1: Zwischen unbehandelten und allergisierten Meerschweinchen ergab sich $\sum R_1 = +55$, was einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 0,005 % entspricht. Zwischen unbehandelten und toxisch behandelten Tieren wurde $\sum R_2 = +55$ ermittelt, was ebenfalls einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 0,005 % entspricht. $\sum R_3$ beträgt +46, -9 und zeigt das Verhältnis zwischen allergischer und toxischer Behandlung. Der Unterschied ist nicht signifikant.

$$\sum R_1 = +55 \quad \alpha = 0,005 \%$$

$$\sum R_2 = +55 \quad \alpha = 0,005 \%$$

$$\sum R_3 = +46, -9 \quad \alpha = 0,025 \%$$

- b) zu V. 2.2: Zwischen unbehandelten und allergisch bzw. toxisch behandelten Tieren wurde $\sum R_1 = +55$ bzw. $\sum R_2 = +55$ berechnet, was einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 0,005 % entspricht. $\sum R_3 = +33,5, -11,5$ ergibt der Vergleich zwischen allergischer und toxischer Behandlung. α ist größer als 0,125 %, somit ist das Ergebnis nicht signifikant.

$\sum R_1 = +55$	$\alpha = 0,005 \%$
$\sum R_2 = +55$	$\alpha = 0,005 \%$
$\sum R_3 = +33,5, -11,5$	$\alpha = 0,025 \%$

- c) zu V. 2.3: Der Vergleich zwischen unbehandelten und allergisch behandelten Tieren bzw. der Erfolgsreaktion ergibt eine hohe Signifikanz. Die Irrtumswahrscheinlichkeit von mehr als 0,025 % besteht zwischen allergischer Behandlung und der Erfolgsreaktion.

Hier ist der Unterschied also nicht signifikant.

$\sum R_1 = +55$	$\alpha = 0,005 \%$
$\sum R_2 = +55$	$\alpha = 0,005 \%$
$\sum R_3 = +36, -19$	$\alpha = 0,025 \%$

- d) zu V. 2.4: Zwischen unbehandelten und toxisch bzw. zweimalig toxisch behandelten Tieren wurde $\sum R_1 = +45$ bzw. $\sum R_2 = +55$ ermittelt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit beträgt weniger als 0,005 %. Der Unterschied zwischen den beiden toxischen Behandlungen ist nicht signifikant.

$\sum R_1 = +45$	$\alpha = 0,005 \%$
$\sum R_2 = +55$	$\alpha = 0,005 \%$
$\sum R_3 = +25,5, -22,5$	$\alpha = 0,025 \%$

VI. DISKUSSION

Das allergische Kontaktekzem gehört zu den zellulären Spättypallergien, wobei die Antikörperfunktion von den T-Lymphozyten versehen wird. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb angenommen, daß bei allergischem Kontaktekzem Veränderungen an den Blutlymphozyten auftreten müssen. Als ein morphologisches Kriterium dieser Lymphozytenveränderung wurden die azurophilen Granula angesehen. Die aufgestellte Hypothese, daß durch Sensibilisierung eine Vermehrung der azurgranulierten Lymphozyten eintritt, wurde am experimentellen allergischen Kontaktekzem bei Meerschweinchen geprüft.

Im Verlaufe des Experimentes wurde eine deutliche Zunahme der azurgranulierten Lymphozyten festgestellt, wobei die Mittelwerte von 8 % auf 21,2 % angestiegen sind. Die Höchstwerte an azurophilen Lymphozyten zeigten bei den einzelnen Meerschweinchen erhebliche Schwankungen. Bei manchen lag die erreichbare Grenze bei 40 %, bei anderen bei 20 % oder auch niedriger. In diesen Fällen lagen die Ausgangswerte der azurgranulierten Lymphozyten allerdings sehr niedrig, beispielsweise bei 2 % oder 4 %. Da alle Meerschweinchen mit ausreichenden Antigenmengen in Kontakt kamen, z.B. durch zusätzliche toxische Pinselung, ist dieser Unterschied vermutlich auf verschiedene Reaktionsfähigkeit einzelner Tiere zurückzuführen.

In der Literatur sind recht abweichende Aussagen über die Häufigkeit der azurgranulierten Lymphozyten zu finden. Die Angaben schwanken zwischen 5 % und 100 %, wenn angenommen wird, daß die azurophilen Granula den Lysosomen entsprechen. Wir haben die azurophilen Granula in unseren nach May-Grünwald-Giemsa gefärbten

Blutausstrichen in durchschnittlich 9 % der Meerschweinchen-Lymphozyten beobachten können.

Wahrscheinlich sind Lysosomen in vielen Zellen so klein, daß sie bei lichtmikroskopischer Betrachtung unter dem Auflösungsvermögen des Mikroskopes liegen und deshalb nicht mehr gesehen werden.

Andererseits kann man während der Sensibilisierung eine von Tag zu Tag zunehmende Größe, Anzahl und Anfärbbarkeit der azurophilen Granula beobachten. Dies könnte entweder auf eine sich erhöhende Stoffwechselleistung der Lysosomen zurückgeführt werden, die durch Sensibilisierung bedingt ist, oder es könnte dadurch bedingt sein, daß Lysosomen, die vorher nicht anfärbbar waren, durch die Sensibilisierung eine Umstellung ihres Stoffwechsels erfahren, die sie nunmehr anfärbbar macht.

Zunächst war etwas überraschend, daß auch bei der toxischen Behandlung eine Vermehrung der azurophilen Lymphozyten auftritt. Es ist aber damit zu rechnen, daß auch toxische Dosen eines Allergens neben der primär toxischen Reaktion zu einer Sensibilisierung führen, die den Anstieg der azurophilen Lymphozyten bedingt. Bei den unbehandelten Tieren dieser Gruppe lagen die azurophilen Lymphozyten bei 12 %, nach Pinselung erfolgte eine Vermehrung auf 27 %, d.h. auf das 2,2fache. Diese Erhöhung entspricht den Ergebnissen, die auch bei den allergisch behandelten Meerschweinchen erzielt wurden.

In der Literatur wird darauf hingewiesen, daß bei einigen Infektionskrankheiten im Kindesalter, wie Keuchhusten, Typhus, Infekten der oberen Luftwege, Hepatitis u.a., die azurophilen Lymphozyten während der Erkrankung deutlich ansteigen. Wahrscheinlich ist dies auch beim Erwachsenen so, leider sind keine Untersuchungen darüber veröffentlicht. Da die Abwehr bei diesen Erkrankungen

hauptsächlich auf zellulärer Immunität beruht, ist anzunehmen, daß die von Gleiss beschriebene Vermehrung der Granula mit dieser Art der Abwehr zusammenhängt. Dafür spricht auch, daß die bei diesen Erkrankungen außerdem beobachtete Gamma-Globulin-Bildung ihren höchsten Wert zu einem anderen Zeitpunkt, als dies bei den azurophilen Lymphozyten der Fall ist, erreicht.

Daß die azurophilen Granula mit der zellulären Immunität im Zusammenhang stehen, zeigt auch das Verhalten der Blutkulturen unter der Behandlung mit Chloroquin und Cortison. Diese Substanzen verhindern die Stimulierbarkeit mit Antigen und PHA, indem sie offensichtlich die Lysosomenmembran stabilisieren. Als Medikamente werden sie ja z.B. bei der Primär-chronischen Polyarthrititis oder beim Lupus erythematoses angewendet, also bei den Autoimmunerkrankungen. Die Membran wird undurchlässig, die hydrolytischen Enzyme können nicht wirken und die Pinozytose und Phagozytose wird verhindert. Die Stimulierbarkeit der Kulturen mit Antigen und PHA im ersten sowie die Autoimmunreaktion im anderen Falle wird damit unterbunden. Der ganze Wirkungsmechanismus von Chloroquin und Cortison ist hiermit sicherlich nicht voll erklärt, aber eine Teilwirkung ist auf die Lysosomen zurückzuführen.

Insgesamt ist über die Entstehung, den Inhalt und die Aufgaben der azurophilen Granula bzw. der Lysosomen bisher wenig bekannt. Keineswegs handelt es sich um Alterungsvorgänge der Zelle, wie ursprünglich angenommen wurde. Möglicherweise erwerben die Lymphozyten ihre Granula in den regionären Lymphknoten. Hier in der Tertiärzone entwickeln sich große pyroninophile Zellen mit viel Plasma als einem Zeichen des gesteigerten Stoffwechsels. Aus diesen entstehen Zellen, die morphologisch den azurophilen Lymphozyten ähneln und für die Sekundärantwort verantwortlich sind.

Die Tatsache, daß die azurophilen Granula hydrolytische Enzyme enthalten, spricht dafür, daß sie sich an hydrolytischen Prozessen beteiligen. Andere Inhaltsstoffe der azurophilen Granula sind noch nicht bekannt. Ebenfalls unbekannt ist die Verbindung, die mit dem angewendeten Farbstoff die typische Azurophilie ergibt.

Die Hydrolyse ist sicher nicht die einzige Tätigkeit der Lysosomen. Bei den Lysosomen verschiedener anderer Zellen sind die Pinozytose und die Phagozytose beschrieben. Dieses legt den Gedanken nahe, daß die Lysosomen der Lymphozyten auch solche Fähigkeiten haben. In diesem Falle könnte das bedeuten, daß das an ein Hautprotein gebundene Antigen von einem zirkulierenden Lymphozyten aufgenommen, spezifisch verarbeitet und in den azurophilen Granula gespeichert wird. Die komplexe Verbindung färbt sich mit verschiedenen Farbstoffen an, so daß die vorher im Lichtmikroskop nicht sichtbaren Lysosomen jetzt azurophil erscheinen. Die Lysosomen, die auch Phagosomen genannt werden, ermöglichen dann im regionären Lymphknoten die Bildung von zellulären Antikörpern.

Eine andere Denkmöglichkeit ist die, daß die Lysosomen die Speicherstätte der Stoffe darstellen, die für die lokale cutan-epidermiale Reaktion verantwortlich sind. Es würde sich gewissermaßen um das "Histamin der Lymphozyten" handeln - in Analogie zu den Granula der Mastzellen. Das vermehrte Auftreten und die Vergrößerung der Granula weisen auf eine gesteigerte enzymatische Aktivität der Immunocyten hin. Mit der Blut- und Lymphzirkulation - eventuell auch aktiv - gelangen diese Zellen an das Zielorgan, in unserem Falle an die Haut. Hier werden die in den Lysosomen gespeicherten Enzyme nach einer vorhergehenden spezifischen Interaktion mit dem Antigen freigesetzt und rufen ihrerseits eine lokale Gefäßerweiterung im Corium hervor, die mit der Ausbildung eines perivascu-

lären rundzelligen Infiltrates und Ödems einhergeht.

Eingangs wurde die Hypothese aufgestellt, daß die lichtmikroskopisch wahrnehmbaren azurophilen Granula als ein morphologisches Kennzeichen der immunkompetenten Lymphozyten gelten können. Die Ergebnisse der am Meerschweinchen durchgeführten Untersuchungen können als eine Bestätigung dieser Hypothese aufgefaßt werden. Ebenso spricht dafür, daß die azurgranulierten Lymphozyten bei den Infektionskrankheiten im Kindesalter ansteigen (31). Auch das Verhalten der mit Chloroquin und Cortison vorbehandelten Blutkulturen während der PHA und Antigenstimulation läßt sich in diesem Sinne deuten (37).

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Auf der Suche nach morphologischen Kriterien zur Unterscheidung der Immunozyten bei allergischem Kontaktekzem von anderen Lymphozyten wurde das Verhalten der azurgranulierten Lymphozyten im Blutserum unter normalen allergischen und toxischen Bedingungen im Tierexperiment untersucht.

Hierzu wurden 40 männliche Meerschweinchen in 4 Gruppen à 10 Tiere eingeteilt. Die ersten 3 Kollektive wurden mit allergischen Dosen von Dinitrochlorbenzol in alkoholischer Lösung epikutan behandelt. Bei den ersten beiden Gruppen wurde anschließend mit einer toxischen Dinitrochlorbenzol-Konzentration gepinselt. Das vierte Kollektiv wurde zweimaliger toxischer Behandlung unterzogen. Die anschließende Erfolgsreaktion zeigte, ob die Behandlung mit dem Allergen zu einer Sensibilisierung führte. An 18 bis 26 Tagen - während und nach der Behandlung - wurden Blutaussstriche angefertigt, nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt und das Auftreten von azurgranulierten Lymphozyten prozentual bestimmt.

Von den 40 Meerschweinchen zeigten 34 eine deutliche positive und 3 eine fragliche Erfolgsreaktion. Bei 3 Meerschweinchen trat keine Hautrötung auf.

Bei unbehandelten Tieren enthielten im Durchschnitt 8 % der Blutlymphozyten azurophile Granula. Nach der Sensibilisierung war die Anzahl auf einen Mittelwert von 21,2 % angestiegen. In allen 4 Gruppen war die Vermehrung der azurgranulierten Lymphozyten ungefähr gleich. Außerdem wurden die azurophilen Granula der Lymphozyten größer und zahlreicher. Bei den meisten Meerschweinchen war eine Korrelation zwischen der Stärke der Erfolgsreaktion und dem prozentuellen Anstieg der azurophilen Lymphozyten zu sehen.

Die Zunahme der azurophilen Granula und ihre Vergrößerung lassen im wesentlichen zwei Deutungen zu. Entweder handelt es sich um einen Anstieg der lysosomalen Enzymaktivität der Zelle, die ihrerseits für die Auslösung der Entzündungssymptomatik verantwortlich gemacht werden kann, oder aber um die morphologischen Zeichen einer Phagozytose des Antigens durch die zirkulierenden Lymphozyten.

Literatur

1. ACKERMANN, G.A.: The Lymphocyte in Immunology and Hematopoiesis. Arnold, London, S.11-30 (1967)
2. ALLISON, A. and L.MALLUCI: Lysosomes in dividing cells, with spez.reference to lymphocytes. Lancet 2, S.1371 (1964)
3. ALTUNIC, A.: Beobachtungen über das Verhalten der Cytoplasma- Granula des Lymphozyten. Klinische Wochenschrift, S.848 (1955)
4. BANDMANN, H.-J.: Beitrag zur Histopathologie allergischer epikutaner Testreaktionen, Hautarzt 11 S.58,310,355 u.393 (1960)
5. BANDMANN, H.-J.: Monozyten bei exper.Kontaktekzeme, Hautarzt 18, S.122-133 (1967)
6. BANDMANN, H.-J.: Die Histologie doppelt exponierter Lappchenproben. Dermatologica 124, S.205-217 (1962)
7. BECKER, I. und J.GLEISS: Az.Lymphozyten in Venen- und Kapillarblut kranker Kinder. Z.Kinderheilkunde 85, S.66-71 (1961)
8. BEGEMANN, H.: Pro Med. (Mainz) 12, S.443 (1951)
9. BEGEMANN, H.: Klinische und experimentelle Beobachtungen am immunisierten Lymphknoten, Freiburg, Ferdinand Schulz (1953)
10. BEGEMANN, H.: Handbuch der inneren Medizin II, Kap.: Blut und Blutkrankheiten: Hrsg.Schwiegk, H., Springer-Verlag 1970
11. BENNET, B. and B.BLOOM: Biological activity of a partially purified migr.inhibitory factor associated with delayed type hypersensitivity. Fed.Proc.27, S.263 (1968)
12. BLOOM, B. and B.BENNET: MIF associated with delayed-type hypersensitivity. Fed.Proc. 27, S.13 (1968)
13. BOYDEN, S.V. and F.SORKIN: The adsorbtion of Antigen by spleen cells previously treated with antiserum in vitro. Immunology 3, S.272 (1960)

14. BRAUN-FALCO, . . und E.KEINING: Dermatologie und Venerologie, S.296-336, J. A. Lehmanns Verlag (1969)
15. BRAUN-FALCO, C.; G. BURG: Histochemische und cytochemische Untersuchungen bei der allergischen DNBC-Kontakt-Dermatitis des Meerschweinchens. Arch.Klin.exper. Dermat. S.307-322, 239 (1970)
16. BRUUN, E.: Acta phato microbiol.scand. The histopathology of the allergie skin reaktionen. S.558 (1941)
17. BURNET, F.M.: The clonal selektion theory of acquired Immunity. Cambridge University Press, Cambridge (1959)
18. BURNET, F.M.: Klonale Selektionstheorie, Austr.J.biol. Sci. 20, S.67 (1957)
19. CASH, J.T.: The dermatitis produced by East Indian satinwood. Brit.med.J. 1911 (II), S.784
20. CIVATTE, A.: Dermatologica Basel, S.102, 105 (1951)
21. CLEMENCON, G.: Azurgranulierte Lymphozyten und ihre Beziehung zur Hepatitis. Dtsch.med.Wschr. 84, S.38 (1959)
22. COOPER, M.D.; GABRIELSEN; GOOD: Role of Thymus... Ann. Rev. Med. 18, S.113 (1967)
23. FISCHER, H.: Zelluläre Aspekte der Immunität. Arbeitsgemeim.für Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen Heft 179, S.23 (1968)
24. FISCHER, R. und A.GROPP: Ergebnisse der Züchtung von Lymphozyten in vitro. Klinische Wochenschrift 44, S.665-671 (1966)
25. FISCHER, R. und A.GROPP: Cytochemie der Lymphozyten in vitro. Klinische Wochenschrift 44 (1966), S.733- 738
26. FREY; WENK: Untersuchungen zur Pathogenese des Kontaktekzems. Dermatologica 112, S.255-305 (1956)
27. FREY; WENK: Über die Funktion der reg.Lymphknoten. Dermatologica 116, S.243-259 (1958)
28. DI GEORGE, A.M.: u.a.: Lancet, S.1377, (1967)
29. GLEISS, J. und H.SPARRER: Über die Bedeutung der az. Lymphozyten bei ak.Infektionskrankheiten des Kindesalters. Z.Kinderheilkunde 72, S.214-222 (1952)

30. GLEISS, J.: Das Verhalten der azurgranulierten Lymphozyten bei Frühgeborenen und Infektionskrankheiten im Kindesalter. Monatsschrift (Mschr.) für Kinderheilkunde 108, S.427-423 (1960)
31. GLEISS, J.: Azurgranulierte Lymphozyten als hämatomorphologischer Nachweis von Antikörpern. Münchner med.Wochenschrift 19, S.1081-1084 (1969)
32. GORDON, A.S.: Struet.Studies of the Lymphocyte and Lymphocyte Development by Ackermann, G.A., Regulation of Hematopoiesis - Vol.2, S.1300-1320
33. GOWANS, J.L.: The Role of Lymphocytes in the destruction of homografts. Brit.Med.Bull 21, S.106 (1965)
34. HAMILTON, L.D. and M.W.CHASE: Labelled cells in the cellular transfer of delayed hypersensitivity Fed.Proc. 21, S.40 (1962)
35. HIRSCHHORN, R. and K.HIRSCHHORN: Appearance of Hydrolase Rich Granules in Human Lymphocytes Induced by PHA and Antigen. Blood 30, No.1 (July) S.84-102 (1967)
36. HUBER, H. und D.PASTNER, D.: Antigenreaktive Lymphozyten. Med.Klin.64 S.1183-1187 (1969)
37. HUMPHREY, J.; WHITE, R.G.: Kurzes Lehrbuch der Immunologie Hrsg. E.Macher, Georg Thieme-Verlag (1971)
38. JESCHAL, F.: Azurgranulierte Lymphozyten und Gamma-Globulinbildung. Klinische Wochenschrift 34, S.974-977 (1956)
39. JOSHI, K.G.; ANDLEIGH, H.S.: Cytochemical demonstration of ac.phosph.activity in blood and bone marrow cells in health and various hematological disorders. Indian J.Med.Reg. 55 S.1184-1190. (1967)
40. LANDSTEINER, K.; CHASE, M.W.: Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. J.exp.Med. 66 S.337 (1937)
41. LANDSTEINER, K.; JAKOBS: Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. J.exp.Med. 64 S.625 u.717 (1936)
42. LANDSTEINER, K.; M.W.CHASE: Experiments on transfer of cutaneous sensitivity to simple compounds. Proc.Soc.exp. Biol. 49 S.688 (1942)
43. LAWRENCE, J.S.: In vitro correlates of delayed hypersensitivity. Fed.Proc. 27, S.3 (1968)

44. MACHER, E.: Die Reaktion der reg. Lymphknoten beim tierexperimentellen allergischen Kontaktekzem. Hautarzt 13, S. 18-23 (1962)
45. MACHER, E.; W. AX, and H. FISCHER: Die Dynamik der zellulären Abwehr. Ärztl. Fortbildung 18, S. 5-11 (1970)
46. MEDAWAR, P. B.: Cellular Aspects of Immunology. Ciba Foundation, Churchill London (1960)
47. MEDAWAR, P. B.: The homograft reaktion. Proc. Roy. Soc., London series B 149, S. 145 (1958)
48. METAXAS: Studies on the passive transfer of tuberculous sensitivity. Immunopathology - 1 Int. Symposium. Hrsg.: Grabar, P. u. Miescher, P., Schwabe Basel (1959)
49. MIESCHER, G.: Ekzem. Histopathologie. Morphologie, Nosologie. Handbuch der d. Haut- u. Geschlechtskrankheiten; Erg. II/1, S. 1-112 (1962)
50. MICHAELIS, L. and A. WOLFF: Über Granula in Lymphozyten. Virch. Arch. path. Anat. 167, S. 151-160 (1902)
51. NAJARIAN, J. and J. FELDMANN: J. exp. Med. 114, S. 779 (1961)
52. NAJARIAN, J. and J. FELDMANN: J. exp. Med. 118, S. 441 (1963)
53. NEXMANN, P. H.: Skin sensitization to nitrogen mustard with reference to the cytogenic differences. Dermatologica (Basel) 100, S. 73-86 (1950)
54. NOSSAL, G. J. F.: Schicksal und Persistenz der Antigene und die Auslösung des Immungeschehens. Triangel (Sandoz), Band 11 Nr. 1, S. 1-6 (1972)
55. RIETHMÜLLER, G. u. s.: Untersuchungen zur Heterogenität humaner Lymphozyten. Klinische Wochenschrift 48, S. 1343-1349 (1970)
56. ROSENAU, W.: Target cell destruction. Fed. Proc. 27, S. 34 (1968)
57. ROSENSZAJN, et. al.: Acid phosphatase activity in normal human blood and bone marrow cells as demonstrated by the azo dye method. Acta Haematologica 30 S. 310-316 (1965)
58. SCHOLICH, W.: Untersuchungen über az. Lymphozyten im Hinblick auf ihre Häufigkeit und Beziehung zum Serumweiß. Med. Diss. Düsseldorf (1959)
59. SPARRER, H.: Über die Lymphozyten-Azurgranulation bei gesunden und kranken Kindern. Med. Diss. Düsseldorf (1951)

60. SPIER, H.W.: Allergie der Haut. Dermatologie und Venerologie (Hrsg. Gotttron und Schönfeld 1961) Band I/1, S.655-704
61. STEFFEN, C.: Allg.u.exper. Immunologie u.Immunpathologie, S.300-365. Georg-Thieme-Verlag (1968)
62. TURK, J. et al.: Int.Archiv off. Allergy 29, S.278-289 (1966)
63. TURK, J.: Cytology of the induction of hypersensitivity. Brit.Med.Bull. 23, S.3 (1967)
64. WALLRAFF, J.: Leitfaden der Histologie des Menschen. Urban-Schwarzenberg Verlag München, S.11-13 (1967)
65. WEBER, E.: Der Zeichen-Rangsummen-Test für gleichwertige Paare von WILCOXON. In Grundriß der biologischen Statistik. Fischer-Verlag Stuttgart, 6.Aufl., S.512-515; 651 (1967)
66. WOLFF, H.H.; BRAUN-FALCO, ...: Zur Ultrastruktur dermalen Veränderungen bei der allergischen Epicutan-testreaktion. Arch.dermat.Forschung 240, S.219-236 (1971).

An dieser Stelle möchte ich Herrn
Professor Dr. Marghescu für die
freundliche Überlassung des Themas
und seine große Hilfsbereitschaft
bei der Durchführung meiner Arbeit
aufrichtig danken.

Lebenslauf

Am 6.11.44 wurde ich, Alfred Kollmann als erstes Kind des Arztes Dr.Gunther Kollmann und seiner Ehefrau Dagmar Kollmann geb. Kvíz in Tschaslau, Tschechoslowakei geboren.

Das Abitur legte ich im Sommer 1958 in Prag ab und begann an der Technischen Hochschule in Pardubitz das Chemiestudium.

Im Sommer 1964 blieben wir mit der ganzen Familie in Westdeutschland. Ein Jahr später bekam ich die Zulassung zum Medizinstudium an der Ludwig-Maximilian-Universität in München.

Im Herbst 1968 heiratete ich die Medizinstudentin Karin Scheurle. Gemeinsam haben wir im Sommer 1971 das Staatsexamen abgelegt.

Die Medizinalassistentenzeit begann ich an der Dermatologischen Universitätsklinik in München und beendete sie im Gemeinschaftskrankenhaus Herdecke, wo ich anschließend auf der inneren Abteilung als Assistenzarzt tätig war.

Ab Sommer 1974 arbeite ich in der psychiatrischen Klinik in Wiesneck.

